

**PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE****Publication number:** JP11255799**Publication date:** 1999-09-21**Inventor:** SUZUKI KOICHI; TANAKA HIROMASA; SATO KENJI**Applicant:** IWATE PREFECTURE**Classification:**

**- international:** C12P21/08; A01K67/033; A01N37/46; C07K1/14;  
 C07K14/435; C07K16/18; C12P21/08; C12P21/08;  
 A01K67/00; A01N37/44; C07K1/00; C07K14/435;  
 C07K16/18; C12P21/08; (IPC1-7): C12P21/08;  
 C07K14/435; A01K67/033; A01N37/46; C07K1/14;  
 C07K16/18

**- European:****Application number:** JP19980058399 19980310**Priority number(s):** JP19980058399 19980310

Report a data error here

**Abstract of JP11255799**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject new peptide comprising a physiologically active peptide separated from a ground material or a humor of an insect belonging to the order Coleoptera, capable of manifesting a growth inhibiting activity against plant pathogenic microbes and useful as an antimicrobial agent, or the like, for plant disease-causing microbes. **SOLUTION:** This new physiologically active peptide (salt) comprises a physiologically active peptide containing an amino acid sequence represented by the formula or a physiologically active peptide, or the like, containing a sequence in which at least one amino acid is deleted, substituted or added in the amino acid sequence represented by the formula and providing an antimicrobial activity and is capable of manifesting a growth inhibiting activity against plant pathogenic microbes and useful as an antimicrobial agent, a germicide, or the like, for plant disease-causing microbes, especially the plant pathogenic microbes. The physiologically active peptide is obtained by subjecting a solution prepared from a ground material or a humor of a dormant imago of an insect belonging to the order Coleoptera [e.g. *Gastrophysa atrocyanea*] to a reversed phase column chromatography, or the like, and fractionating the solution.

Ala	Val	Arg	Ile	Gly	Pro	Cys	Asp	Gln	Val	Cys	Pro	Arg	Ile	Val	Pro
1				5				10						15	
Glu	Arg	His	Glu	Cys	Cys	Arg	Ala	His	Gly	Arg	Ser	Gly	Tyr	Ala	Tyr
			20					25						30	
Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Met	Tyr	Cys	Asp							
			35				40								

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-255799

(43) 公開日 平成11年(1999) 9月21日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I
C 0 7 K 14/435	Z N A	C 0 7 K 14/435 Z N A
A 0 1 K 67/033	5 0 2	A 0 1 K 67/033 5 0 2
A 0 1 N 37/46		A 0 1 N 37/46
C 0 7 K 1/14		C 0 7 K 1/14
16/18		16/18

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-58399

(22) 出願日 平成10年(1998) 3月10日

(71) 出願人 390025793

岩手県

岩手県盛岡市内丸10番1号

(72) 発明者 鈴木 幸一

岩手県盛岡市永井23-32-23

(72) 発明者 田中 弘正

岩手県盛岡市上田4-11-7 コートビレッジ上田207号

(72) 発明者 佐藤 研二

岩手県北上市大通り3-10-32 アーバンハイツS-202

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 生理活性ペプチド

(57) 【要約】

【課題】 生理活性ペプチドの提供。

【解決手段】 以下の(a)又は(b)の生理活性ペプチド又はその塩。

(a) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列を含む生理活性ペプチド

(b) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、かつ抗菌活性をもたらす生理活性ペプチド

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)の生理活性ペプチド又はその塩。

(a) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列を含む生理活性ペプチド

(b) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、かつ抗菌活性をもたらし生理活性ペプチド

【請求項2】 甲虫目に属する昆虫の磨砕物又は体液から請求項1記載の生理活性ペプチド又はその塩を採取することを特徴とする生理活性ペプチド又はその塩の製造方法。

【請求項3】 甲虫目に属する昆虫がコガタリハムシ (*Gastrophysa atrocyanea*) である請求項2記載の製造方法。

【請求項4】 請求項1記載の生理活性ペプチド又はその塩を有効成分として含む抗菌剤。

【請求項5】 請求項1記載の生理活性ペプチド又はその塩に対する抗体。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、昆虫の休眠成虫から得られる新規な生理活性ペプチド又はその塩に関する。

【0002】

【従来の技術】細菌その他の異物を昆虫に接種したり、単に昆虫の体表を傷つけるなどの物理的刺激を加えると、体液中に様々な抗菌性ペプチドが誘導されることが知られているが、一方、誘導とは関係なく本来的に昆虫の体液中に存在する抗菌性ペプチドも知られている[Rao, A. G. : Mol. Plant-Microbe Interact., 8 : 6 (1995)]。これらの抗菌性ペプチドは、抗体生産能を持たない昆虫にとって、細菌(グラム陰性細菌、グラム陽性細菌等)や菌類(かび、きのこ等)による感染を防ぐために重要な役割を担っているものと考えられている。

【0003】昆虫起源の抗菌性ペプチドのうち抗菌類活性を示し化学構造と諸性質が明らかにされているものには、例えば、センチニクバエ(*Sarcophaga peregrina*)由来の抗菌類タンパク質[Antifungal Protein (AFP)] [Iijima, R. et al. : J. Biol. Chem., 268 : 12055 (1993)]、*Holotrichia diomphalia*(コガネムシ科に属する昆虫)由来のホロトリシン3(*Holotricin*3) [Lee, S. Y. et al. : Biol. Pharm. Bull., 18 : 1049 (1995)]、チャイロコメノゴミムシダマシ(*Tenebrio molitor*)由来のテネシン3(*Tenecin*3) [Jung, Y. H. et al. : Mol. Cells, 5 : 287 (1995)]、およびショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)由来のドロソマイシン(*Drosomycin*) [Fehlbaum, P. et al. : J. Biol. Chem., 269 : 33159 (1994)]がある。

【0004】また、植物においても、種子、花、葉その

他の組織における抗菌類ペプチドの存在が明らかにされ、その多くが分離・精製され化学構造と諸性質が明らかにされている[Rao, A. G. : Mol. Plant-Microbe Interact., 8 : 6 (1995)およびBroekaert, W. F. et al. : Plant Physiol., 108 : 1353 (1995)]。植物起源の抗菌類ペプチドは、植物の病原性菌類に対する防御機構に関与するペプチドの一つとして役立っているものと考えられている。しかしながら、これまでに知られている全ての昆虫由来の抗菌性ペプチドは、代謝活性が活発な発育期にある幼虫、蛹または成虫から見出されたものであり、発育が停止し代謝活性が著しく低下した状態にある休眠中の幼虫、蛹または成虫からの抗菌性ペプチドは全く知られていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、休眠中の昆虫からの生理活性ペプチド又はその塩を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、甲虫目コレオプテラ(*Coleoptera*)に属する昆虫、とりわけコガタリハムシ(*Gastrophysa atrocyanea*)の休眠成虫に特異的に存在する新規なペプチドを分離・精製することに成功し、さらに、このペプチドが意外にも植物病原性菌類に対して発育阻止活性を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明は、以下の(a)又は(b)の生理活性ペプチド又はその塩である。

(a) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列を含む生理活性ペプチド

(b) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、かつ抗菌活性をもたらし生理活性ペプチド

【0008】さらに、本発明は、甲虫目に属する昆虫の磨砕物又は体液から前記生理活性ペプチド又はその塩を採取することを特徴とする生理活性ペプチド又はその塩の製造方法である。甲虫目に属する昆虫としては、例えばコガタリハムシ(*Gastrophysa atrocyanea*)が挙げられる。さらに、本発明は、前記生理活性ペプチド又はその塩を有効成分として含む抗菌剤である。さらに、本発明は、前記生理活性ペプチド又はその塩に対する抗体である。

【0009】以下、本発明を詳細に説明する。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明の生理活性ペプチドは、上述のように、既に報告されている他の昆虫起源の抗菌性ペプチドとは異なり、発育が停止し代謝活性が著しく低下した状態にある休眠期間の成虫中に存在するものである。そして、本発明の生理活性ペプチドは、各種植物病原菌に対して広い抗菌スペクトルを有する新規な抗菌性

ペプチドである。また、本発明の生理活性ペプチドは、昆虫、特に甲虫目に属する昆虫の休眠成虫の全体、胸部又は脂肪体と適当な溶媒との磨砕物、あるいは体液から採取することにより得ることができる。

#### 【0011】1. ペプチドの精製

本発明の生理活性ペプチド又はその塩(「本ペプチド」ともいう)の採取源となる生物は昆虫であり、なかでも甲虫目コレオプテラ(Coleoptera)に属する昆虫が好ましい。甲虫目に属する昆虫としては、例えばハムシ科(Chrysomelidae)、コガネムシ科(Scarabaeidae)、ゴミムシダマシ科(Tenebrionidae)に属する昆虫が挙げられる。そして、ハムシ科に属する昆虫としてはコガタリハムシ(*Gastrophysa atrocyanea*)、キスジノミハムシ(*Phyllotreta striolata*)などが挙げられ、コガネムシ科に属する昆虫としてはコガネムシ(*Mimela splendens*)やタイワンカブトムシ(*Oryctes rhinoceros*)などが挙げられ、ゴミムシダマシ科に属する昆虫としてはチャイロコメノゴミムシダマシ(*Tenebrio molitor*)やコタヌストモドキ(*Tribolium castaneum*)などが挙げられる。

【0012】これらの昆虫の中では、特にコガタリハムシが好ましい。なお、コガタリハムシは、タデ科(Polygonaceae)の雑草、例えばエゾノギシギシ(*Rumex obtusifolius*)を好んで摂食する日本土着の昆虫であり、春になって休眠から覚醒した越冬成虫がこの雑草の葉に産卵し、孵化した幼虫は葉を食害しつつ成長して蛹となり、初夏に発生した新成虫は土に潜って休眠に入り、翌春まで越冬越冬することが知られている[内藤 篤ら:「21雑草の生物的防除」, 石井象二郎編 昆虫学最近の進歩: 312ページ, 東京大学出版会(1981)]。

【0013】本発明の生理活性ペプチド又はその塩の採取源として対象となる昆虫は、前記昆虫の成虫であって休眠中のものが好ましい。「成虫」とは、発育の最終段階にある昆虫の形態を有するものであり、かつ、完成した運動機能、代謝機能、生理機能および生殖機能を有するものを意味する。また、「休眠」とは、内分泌機構の支配による自律的な発育休止状態のことをいう。従って、昆虫の発育にとって不利な環境条件(例えば、夏季、冬期、乾季)においては、昆虫が自らの発育を積極的に停止させ、休眠中の昆虫の運動機能と代謝機能は著しく低下している。本発明では、特に休眠中のコガタリハムシ成虫が好ましい。

【0014】本発明の生理活性ペプチド又はその塩は、上記昆虫(休眠中の成虫)の全体、胸腹部または脂肪体と適当な抽出溶媒との磨砕物、あるいは体液を遠心分離して細胞を除去し、得られた上清を分離・精製工程に付すことにより得ることができる。昆虫の全体、胸腹部または脂肪体と適当な抽出溶媒とを混合して磨砕するには、公知の任意の手法を用いて行うことができる。例えば、数頭の昆虫の体全体又は胸腹部若しくは脂肪体を乳鉢等に入れてすりつぶし、抽出溶媒を混合することによ

り磨砕物の懸濁液を得る。抽出溶媒としては、例えば、生理食塩水、酢酸、メチルアルコール等の水溶液等が挙げられる。

【0015】昆虫の体液は公知の任意の方法を用いて採取することができる。例えば、はさみ等を用いて内臓を損傷させずに皮膚を切り裂くことにより、あるいは腹足をハサミ等で切断することにより、又は腹足の基部に針を突き刺すことにより、浸出した体液を適当な容器に採取することができる。本発明の生理活性ペプチド又はその塩の分離・精製には、一般のタンパク質やペプチドの分画と精製に慣用される様々な方法が適用される。例えば、前記磨砕物の懸濁液又は体液を遠心分離にかけ、細胞残骸や組織残骸を除去した後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせることで用いることにより、本発明の生理活性ペプチドを単離精製することができる。

【0016】本発明において、特にコガタリハムシの休眠成虫を用いる場合は、例えば、TSK ODS-80Tsゲル(東ソー株式会社製)による逆相クロマトグラフィーによって活性成分を含む画分を分取し、この分取した画分について再び同ゲルによる逆相クロマトグラフィーを行い、活性成分を単一の物質に精製する方法が好適である。精製されたペプチド又はその塩が抗菌活性を有するか否かの確認は、アルタナリア菌(*Alternaria alternata*)、灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*)、いもち病菌(*Magnaporthe grisea*)などの植物病原菌の胞子の発芽が本発明のペプチドにより抑制されるか否かを調べることにより行うことができる。本発明では、例えば96穴マイクロプレートを使用する方法[Cammue, B. P. A. et al.: J. Biol. Chem., 267: 2228 (1992)]によって行うことができるがこれに限定されるものではない。

【0017】すなわち、公知の過滅菌済み合成培地[Cammue, B. P. A. et al.: J. Biol. Chem., 267: 2228 (1992)]に胞子を懸濁させて得られる胞子懸濁液を96穴マイクロプレートの各穴に入れた後、本発明のペプチドを添加してインキュベートし、所定時間(例えば0時間目と48時間後)における595nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(BIO-RAD製、Model 3550-UV)を用いて測定する。得られた測定値(吸光度の経時変化)から、菌体の発育阻止率を計算する。

【0018】発育阻止率(%)は、以下の式により算出することができる。

$$\text{発育阻止率(\%)} = [(\Delta C - \Delta T)] / \Delta C \times 100$$

ここで、 $\Delta C$ は対照試料(本発明のペプチドを含まない被検液)における吸光度の変化(例えば48時間後の吸光度から0時間における吸光度を引いた値)、 $\Delta T$ は被検液における吸光度の変化である。

【0019】なお、上記抗菌活性の測定方法は、本発明のペプチド又はその塩を精製する途中において、クロマトグラフィーの各画分が抗菌活性を有しているか否かを確認するためにも用いることができる。精製後のペプチドの配列は、エドマン分解法等の公知手法を用いて決定することができる。通常は、島津製作所の自動アミノ酸分析装置により配列決定が行われる。

【0020】本発明のペプチドのアミノ酸配列を配列番号1に例示するが、本発明のペプチドが抗菌活性を有する限り、当該アミノ酸配列の一部に欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。例えば、配列番号1で表わされるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~5個のアミノ酸が欠失してもよく、又は、配列番号1で表わされるアミノ酸配列に少なくとも1個、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~5個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号1で表わされるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~5個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。ここで抗菌活性とは、静菌活性及び殺菌活性のいずれをも意味するものであり、対象となる菌を死滅させる活性及び増殖を抑制する活性の両者を含む。

【0021】一旦本発明のペプチドのアミノ酸配列が決定されると、その後は、通常行われているペプチド化学合成により本発明の生理活性ペプチド又はその塩を得ることができる。また、前記変異を有するアミノ酸配列からなるペプチド又はその塩についても化学合成により得ることができる。本発明のペプチド又はその塩としては、生理学的に許容される酸付加塩または塩基性塩が好ましい。酸付加塩としては、例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸などの無機酸との塩、あるいは酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などの有機酸との塩が挙げられる。塩基性塩としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化マグネシウムなどの無機塩基との塩、あるいはカフェイン、ピペリジン、トリメチルアミン、ピリジンなどの有機塩基との塩が挙げられる。

【0022】塩は、塩酸などの適切な酸、あるいは水酸化ナトリウムなどの適切な塩基を用いて調製することができる。例えば、水中、又はメタノール、エタノール若しくはジオキサンなどの不活性な水混和性有機溶媒を含む液体中で、標準的なプロトコルを用いて処理することにより調製し得る。なお、処理温度は0~100℃であるが、室温が好ましい。なお、本発明のペプチドの生化学的、物理化学的性質は、質量分析、核磁気共鳴、電気泳動、高速液体クロマトグラフィー等により分析することができる。

【0023】2. 本発明のペプチドの化学合成

本発明のペプチド又はその塩の化学合成を行う場合は、ペプチドの合成の常法手段によって合成できる。例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、カルボイミダゾール法、酸化還元法等が挙げられる。また、その合成は、固相合成法及び液相合成法のいずれをも適用することができる。すなわち、本発明のペプチド又はその塩を構成し得るアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的とするペプチド又はその塩が合成される。縮合方法や保護基の脱離としては、公知のいずれの手法を用いてもよい〔例えばBodanszky, M and M.A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)、Schroeder and Luecke, The Peptide, Academic Press, New York (1965)、泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(1975)等を参照〕。

【0024】反応後は、通常精製法、例えば溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて本発明のペプチド又はその塩を精製することができる。また、本発明のペプチド又はその塩は、C末端が通常カルボキシル(-COOH)基又はカルボキシレート(-COO<sup>-</sup>)であるが、C末端がアミド(-CONH<sub>2</sub>)又はエステル(-COOR)であってもよい。ここで、エステルにおけるRとしては、炭素数1~12のアルキル基、炭素数3~10のシクロアルキル基、炭素6~12のアリール基、炭素数7~12のアラルキル基などが挙げられる。さらに、本発明のペプチド又はその塩には、N末端のアラニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合した糖ペプチドなどの複合ペプチド等も含まれる。

【0025】3. 本発明のペプチドの遺伝子工学的手法による生産

本発明においては、本発明のペプチドを遺伝子工学的に設計し、得ることができる。

(1) 本発明のペプチドをコードするDNAの取得

本発明のペプチドをコードするDNA(「ダイアボジン遺伝子」又は「ダイアボジンDNA」ともいう)は、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記昆虫の細胞、組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAから得られるいずれのものでもよい。従って、例えば、本発明のペプチドの一部のアミノ酸配列をもとに設計された部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて、昆虫から得られたDNAを鋳型としてPCR法によって増幅することにより、ダイアボジンDNAを得ることができる。

【0026】また、昆虫から得られたDNAを適当なベクターに組込み、これと、例えば<sup>32</sup>P等で標識したダイアボジンDNA断片又は標識した合成DNAとのハイブリダイゼーションによってダイアボジンDNAを選別することができる。ハイブリダイゼーションは、公知の手法又はそれに準ずる手法に従って行うことができる(例えば Sambro

ok, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。さらに、前記昆虫の細胞、組織より全RNA又はmRNA画分を調製し、これらのRNAを用いたRT-PCR(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)によって増幅することもできる。

【0027】本発明のダイアボジンDNAとしては、当該ダイアボジンをコードするDNA、又はダイアボジンDNAの塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列を有し、かつ本発明のペプチド又はその塩と同質の活性をもたらすペプチドをコードするものが挙げられる。ここで、ストリンジェントな条件とは、例えばナトリウム濃度が1~1000mM、好ましくは10~300mMであり、温度が40~70℃、好ましくは65℃での条件をいう。本発明では、ダイアボジンDNAに変異を導入して発現させ、本発明のペプチド又はその塩と実質的に同質の変異ペプチド又はその塩を作製することもできる。この場合は、部位特異的突然変異誘発法(例えばMutant-K(宝酒造社)やMutant-G(宝酒造社))などを用いて、Kunkel法や Gapped duplex法等の公知手法又はこれに準ずる方法によりDNAに変異を導入することができる。

【0028】(2) 組換えベクター及び形質転換体の作製  
(i) 組換えベクターの作製

クローン化されたDNAは、そのまま又は所望により適当な制限酵素で消化し、あるいは適当なリンカーを連結して使用することができる。これらのDNAを適当なベクターに連結(挿入)することにより組換えベクターを得る。DNAを挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えばプラスミド DNA、ファージ DNA等が挙げられる。プラスミドDNAとしては、例えばpBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pBluescript II SK+/、pGEM4、pSP64、pSP65等が挙げられる。また、ファージ DNAとしては、例えば M13mp18、M13mp19、 $\lambda$ gt10等が挙げられる。

【0029】ベクターにダイアボジンDNAを挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。本発明におけるダイアボジンDNAは、そのDNAの機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、ベクターには、プロモーター、ダイアボジンDNAのほか、エンハンサー、ターミネーター、リボソーム結合配列、スプライシングシグナル、選択マーカー等を組み込んでもよい。この場合、ターミネーターとしてはSV40が挙げられ、リボソーム結合配列としてはlacZが挙げられ、選択マーカーとしてはジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

【0030】(ii) 形質転換体の作製

本発明において、形質転換体は、発現用組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入するこ

とにより得ることができる。ここで、宿主としては、ダイアボジンDNAを発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、エッシャーヒア・コリ(*Escherichia coli*)等のエッシャーヒア属、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)等のバチルス属、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)等のシュードモナス属、若しくはリゾビウム・メリロティ(*Rhizobium meliloti*)等のリゾビウム属に属する細菌、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)若しくはシズサッカロミセス・ボンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)等の酵母、COS細胞若しくはCHO細胞等の動物細胞、又はSf9若しくはSf21等の昆虫細胞等が挙げられる。

【0031】大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、ダイアボジンDNAを含む組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、ダイアボジンDNA、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。プロモーターとしては、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えばtrpプロモーター、lacプロモーター、 $P_L$ プロモーター、 $P_R$ プロモーターなどの、大腸菌又はファージに由来するプロモーターが用いられる。tacプロモーターなどのように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。

【0032】細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されない。例えばカルシウムイオンを用いる方法[Cohen, S.N. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69: 2110(1972)]、エレクトロポレーション法等が挙げられる。酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばYEpl3、YEpl24、YEp50等が用いられる。この場合のプロモーターとしては、酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えばGAL1プロモーター、GAL10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、GAPプロモーター等が挙げられる。

【0033】酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法[Becker, D.M. and L. Guarente: Methods. Enzymol., 194: 182(1990)]、スフェロプラスト法[Hinnen, A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75: 1929(1978)]、酢酸リチウム法[Itoh, H. et al.: J. Bacteriol., 153: 163(1983)]等が挙げられる。動物細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばpcDNA1.1/Amp、pcDNA1.1(いずれもInvitrogen社)、pSI Vector、pCI Vector(いずれもPromega社)等が用いられる。この場合、プロモーターとしてヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。

【0034】動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カル

シウム法、リポフェクション法等が挙げられる。昆虫細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばpVL1392、pVL1393(いずれもInvitrogen社)、pMBac(Stratagene社)、pBacPAK8/9(Clontech社)等が用いられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

【0035】(iii) 本発明の生理活性ペプチドの生産  
本発明の生理活性ペプチドは、前記形質転換体を培地に培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含む、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0036】炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン、マルトース、デキストリン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステイアプリカー、カザミノ酸、NZアミン等が用いられる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム、硫酸亜鉛、塩化コバルト等が用いられる。

【0037】培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、30℃で24～96時間行う。培養期間中、pHは5.0～8.0に保持する。pHの調整は、無機又は有機の酸、アルカリ溶液等を用いて行う。培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のものを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

【0038】動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常、5%CO<sub>2</sub>存在下、20～30℃で1～7日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加し

てもよい。昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、Grace's Insect Medium(Grace, T.C.C. Nature, 195:788, (1962))に10%ウシ胎児血清などの添加物を適宜加えたものなどが挙げられる。培地のpHは6.0～7.0に調製し、通常25℃で1～7日培養を行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0039】培養後、本発明のペプチド又はその塩が菌体内又は細胞内に生産される場合には菌体又は細胞を破碎する。一方、本発明のペプチド又はその塩が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去し、上清を得る。そして、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせることで用いることにより、上記培養物中(細胞破碎液、培養液、又はそれらの上清中)から本発明の生理活性ペプチド又はその塩を単離精製することができる。

#### 【0040】4. 抗菌剤

本発明の抗菌性ペプチド又はその塩は、その抗菌スペクトルが広いこと、抗菌剤として有用である。さらに、本発明の抗菌性ペプチドは、植物病原菌に対してその抗菌作用を有するため、特に植物病原性菌類に対する抗菌剤として有用である。また、本抗菌性ペプチド又はその塩は他の農薬と組み合わせた形態、例えば、殺菌剤(イネ害虫用殺虫剤等)との組み合わせによる殺虫殺菌剤、植物成長調整剤(イネ矮化剤等)との組み合わせによる殺菌植物調整剤としての形態等で使用することができる。すなわち、本抗菌性ペプチド又はその塩は、それ単独で、あるいは適当な液体、固体又は気体の担体と組み合わせる使用することができる。さらに必要に応じて、液化ガス、噴射剤(フレオン等)、表面活性剤(乳化剤、分散剤、消泡剤等)等を添加し、乳剤、油剤、水和剤、粉剤、粒剤、液剤等の製剤として使用することもできる。

【0041】製剤に使用する液体担体としては、例えば、キシレン、トルエン、ベンゼン、アルキルナフタレン等の芳香族炭化水素；クロロベンゼン、クロロエチレン、塩化メチレン等の塩素化芳香族炭化水素；シクロヘキサン、パラフィン等の脂肪族炭化水素；鉱油留分；エタノール、ブタノール、グリコール等のアルコール及びこれらのエーテル類ならびにエステル；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン；ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、水等の極性溶剤が挙げられ、これらの1種又は2種以上を混合して使用することができる。水が溶剤として用いられる場合、純水、または無機塩類(塩化ナトリウム、塩化カリウム等)、糖(グルコース、ショ糖等)若しくは糖アルコール(D-ソルビトール、D-マンニトール等)の水溶液を用いることができる。

【0042】また、製剤に使用する固体担体としては、例えば、カオリン、粘土、タルク、チョーク、石英、アタパルジャイト、モンモリロナイト、珪藻土等の天然鉱物粉末、ケイ酸、アルミナ、ケイ酸塩等の合成鉱物粉末、高分子性天然物(結晶性セルロース、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸等)が挙げられ、これらの1種又は2種以上を混合して使用することができる。乳化剤、消泡剤、分散剤等として使用される表面活性剤としては、ポリオキシエチレン-脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン-脂肪アルコールエーテル、アルキルアリアルポリグリコールエーテル、アルキルスルホネート、アルキルサルフェート、アリアルスルフォネート、アルブミン加水分解物、リグニン-亜硫酸廃液、メチルセルロース、アラビアゴム等が挙げられる。

【0043】有効成分である本発明の抗菌性ペプチドは、乳剤では0.1~95重量%、水和剤では0.1~60重量%、粒剤では0.1~60重量%であるが、使用目的によってはこれらの濃度は適宜変更してもよい。乳剤、水和剤の場合には、使用に際して水で希釈して、0.0001~10重量%とすることができ、好ましくは0.01~1重量%とすることができる。本発明の抗菌剤は、噴霧法、ミスト法、ダスト法、散布法、注入法等を用いて、植物病原菌に侵された植物に直接投与してもよく、あるいは植物病原菌による汚染土壌に直接投与してもよい。使用方法是、使用目的に基づいて選択されるが、いずれの場合にも本発明の抗菌性ペプチドが可能な限り均一に分散されることが望ましい。本発明の抗菌剤の使用量は、その使用方法により異なるが、例えば、噴霧法の場合、10a当たり、有効成分で1~1000g噴霧するのが好ましい。

【0044】本発明の抗菌性ペプチドを抗菌剤として使用するべき対象となる植物病原性菌類としては、アルタナリア菌、灰色かび病菌、いもち病菌等が挙げられる。これらの植物病原性菌は具体的には、アルタナリア菌はリンゴ(*Malus domestica*)、ナシ(*Pyrus L.*)、イチゴ(*Fragaria ananassa*)、及びタバコ(*Nicotiana tabacum*)等の栽培植物を侵す病原菌であり、灰色かび病菌はキュウリ(*Cucumis sativus*)、トマト(*Lycopersicon esculentum*)、ピーマン(*Capsicum annuum*)、レタス(*Lactucasativum*)、イチゴ(*Fragaria ananassa*)、ブドウ(*Vitis L.*)、スターチス(*Limonium Mill.*)、トルコギキョウ(*Eustoma grandiflorum*)、リンドウ(*Gentiana L.*)、タバコ(*Nicotiana tabacum*)、及びホップ(*Humulus lupulus*)等の栽培植物を侵す病原菌であり、いもち病菌はいね(*Oryza sativa*)などの栽培植物を侵す病原菌である。従って、これらの病原菌による病害を防除または予防することを目的として、前記植物に本発明ペプチドを含有する抗菌剤を使用することが好適である。

【0045】さらに、本発明の抗菌性ペプチドは、例えば、真菌性疾患に対する薬剤としても使用することができる。その場合は、投与の剤型及びその投与量について

は、被検体(ヒト及び動物を包含する)及び疾患の種類、症状等を勘案して、本発明による抗菌効果が認められる限り任意の選択が可能である。例えば投与量は、約0.001~約10mg/kg体重であり、好ましくは、約0.025~約0.5mg/kg体重である。

#### 【0046】5. 食品及び飼料添加物

さらに、本発明の抗菌性ペプチドは、胃や腸に存在するタンパク質分解酵素により容易に分解されるため、少なくとも結果的に経口投与されるときには、その毒性はほとんどないと考えられる。したがって、本発明の抗菌性ペプチドは、食品又は飼料添加物として利用することができる。例えば、本ペプチドを、固体のまま、または液体好ましくは水に適切な濃度になるように溶解し、食品または飼料に、例えば、混合、浸漬、塗布、噴霧等の方法で添加し得る。その結果、本ペプチドは、食肉、魚、野菜等の生鮮食品又は加工食品、あるいは豆粉、魚粉飼料等の飼料のかび等の発生を防ぐことができる。例えば有効成分である本発明抗菌性ペプチドを水溶液として用いる場合、0.0001~1重量%、好ましくは0.001~0.1重量%とすることができる。

#### 【0047】6. 本発明のペプチドをコードするDNAの植物体への導入

さらに、遺伝子工学的手法を用いて本発明の抗菌性ペプチドをコードするDNAを植物宿主に導入することによって、植物病原菌、特に植物病原性菌類に対する抵抗性を有するトランスジェニック植物を作製することができる。従って、遺伝子工学的手法による栽培植物への本抗菌性ペプチド遺伝子の導入は、植物を植物病原性菌類から防護するための有効な手段となる。なお、遺伝子は、前記3.において調製されたDNAを用いることができる。ここで、植物宿主とは、前記栽培植物の植物体全体、植物器官(例えば葉、花弁、茎、根、根茎、種子等)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等)又は植物培養細胞のいずれをも意味するものである。

【0048】植物体、植物器官又は植物組織を宿主とする場合、本発明のペプチドをコードするDNAは、採取した植物切片にベクターをアグロバクテリウムのバイナリーベクター法、パーティクルボンバードメント法、又はポリエチレングリコール法で導入し、植物宿主を形質転換することができる。あるいはプロトプラストにエレクトロポレーション法で導入して形質転換植物を作製することもできる。形質転換の結果得られるシュート、毛根などは、細胞培養、組織培養又は器官培養に用いることが可能であり、また従来知られている植物組織培養法を用い、適当な濃度の植物ホルモンの投与などにより植物体に再生させることができる。

【0049】植物培養細胞を宿主として用いる場合は、形質転換は、培養細胞に、本発明のペプチドをコードするDNAを有するベクターをエレクトロポレーション法又はアグロバクテリウムのバイナリーベクター法若しくは



パーティクルガン法、あるいはポリエチレングリコール法で導入し、以下、前記と同様にして細胞培養、組織培養、器官培養及び植物体を得ることができる。

【0050】7. 本発明のペプチドに対する抗体  
本発明においては、本発明のペプチドに対する抗体を作製することもできる。「抗体」とは、抗原である本発明のペプチドに結合し得る抗体分子全体またはその断片（例えば、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>断片）を意味し、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。本発明の抗体は、種々の方法のいずれかによって製造することができる。このような抗体の製造法は当該分野で周知である[例えばSambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)を参照]。

【0051】(1)本発明の抗菌ペプチドに対するポリクローナル抗体の作製

前記のようにして天然物から精製又は化学合成した本発明のペプチド又はその断片を抗原として、これを哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物1匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは、0.1～10mgであり、アジュバントを用いるときは、1～100μgである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバントが挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内等に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、好ましくは2～5週間間隔で、1～10回、好ましくは2～5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から6～60日後に、好ましくは、酵素免疫測定法(EIA; enzyme immunoassay)、放射性免疫測定法(RIA; radioimmuno assay)等で抗体価を測定し、最大の抗体価を示した日に、採血し、抗血清を得る。抗血清から、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

【0052】(2)本発明の抗菌ペプチドに対するモノクローナル抗体の作製

(i) 抗体産生細胞の採取

前記のようにして天然物から精製又は化学合成した本発明のペプチド又はその断片を抗原として、これを哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物1匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは、0.1～10mgであり、アジュバントを用いるときは、1～100μgである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバントが挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限

定されず、数日から数週間間隔で、好ましくは2～5週間間隔で、1～10回、好ましくは2～5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から1～10日後、好ましくは、3日後に、抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、抹消血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞又は局所リンパ節細胞が好ましい。

【0053】(ii)細胞融合

ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミンを含む)で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。ミエローマ細胞の具体例としては、P3X63-Ag.8.U1(P3U1)、Sp2/0、NS-1などのマウスミエローマ細胞株が挙げられる。

【0054】次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まないDME M、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用培地中で、1×10<sup>9</sup>個/mlの抗体産生細胞と1×10<sup>8</sup>個/mlのミエローマ細胞とを等容量混合し、細胞融合促進剤存在のもとで融合反応を行う。細胞融合促進剤として、平均分子量1,500ダルトンのポリエチレングリコール等を使用することができる。また、電気刺激(例えばエレクトロポレーション)を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

【0055】(iii) ハイブリドーマの選別及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、細胞懸濁液を例えばウシ胎児血清含有RPMI-1640培地などで適当に希釈後、マイクロタイタープレート上に2×10<sup>6</sup>個/ウエル程度まき、各ウエルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、約14日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

【0056】次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウエルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法等によって行うことができる。融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生細胞であるハイブリドーマを樹立する。

【0057】(iv)モノクローナル抗体の採取

樹立したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の方法又は腹水形成法等を採用することができる。細胞培養法においては、ハイブ

リドーマを10%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培地、MEM培地又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件(例えば37℃、5%CO<sub>2</sub>濃度)で2~10日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。腹水形成法の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物の腹腔内にハイブリドーマを約 $1 \times 10^7$ 個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1~2週間後に腹水または血清を採集する。

【0058】上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。このようにしてポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体が得られた後は、これをリガンドとして、固体担体に結合させることによりアフィニティークロマトグラフィーカラムを作製し、そして該カラムを用い、前記の採取源又は他の採取源から、本発明のペプチドを精製することができる。さらにこれらの抗体は本発明のペプチドを検出するためにウエスタンブロッティングに用いることもできる。

【0059】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例1〕抗菌性ペプチドの分離・精製

6.25頭相当(約100mg)のコガタリハムシ休眠成虫(1ヵ月後)を、300 $\mu$ lの90%メチルアルコール溶液(メチルアルコール:水:酢酸=90:9:1)とともに氷冷下で磨砕した後、4℃で10,000 $\times$ g/20分間の遠心分離に供した。得られた透明な上清を遠心乾燥して溶媒を除去し少量の超純水に再溶解した後、0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化しておいたTSK ODS-80Tsゲル(東ソー株式会社、4.6 $\times$ 250mm)による一回目の逆相カラムクロマトグラフィーに供した。

【0060】溶出は、0.1%トリフルオロ酢酸でカラムを洗浄した後、0%~99.9%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸(流出速度=1ml/分)という溶出条件で行った。210nmでの吸光度を指標にして、各ピークに対応する画分を採取し、それぞれの画分の少量を遠心乾燥し、実施例3に記載の方法により抗菌活性の存在を確認し

Ala-Val-Arg-Ile-Gly-Pro-Cys-Asp-Gln-Val-Cys-Pro-Arg-Ile-Val-		
5	10	15
Pro-Glu-Arg-His-Glu-Cys-Cys-Arg-Ala-His-Gly-Arg-Ser-Gly-Tyr-		
20	25	30
Ala-Tyr-Cys-Ser-Gly-Gly-Gly-Met-Tyr-Cys-Asn		
35	40	

【0064】アミノ酸配列に基づいて算出したダイアボジンの分子量4,467Daは、MALDI-TOFMSスペクトルによるダイアボジンの平均分子量4,466Da(最大誤差0.1%)と

た。その結果、抗菌活性を有する画分を得ることができた(図1、矢印のピーク=600 $\mu$ l, 保持時間=約33分)。その活性画分をTris-TRICINE SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS電気泳動ともいう)にかけたところ、分子量7.9kDaの位置に主要バンドが検出された(図2、矢印)。このようにして分子量7.9kDaのペプチドを含むことが明らかとなったピークについてそれを分取し、流出速度を0.5ml/分とした以外は一回目と同じ溶出条件で二回目の逆相カラムクロマトグラフィーに供した。

【0061】その結果、図3に示したように、矢印の部分に単一のピーク(600 $\mu$ l, 保持時間=約50分)が表れ、この画分をSDS電気泳動にかけたところ、分子量7.9kDaの純粋なペプチドが得られたことが確認された(図4、矢印)。この矢印のピークを分取し、遠心乾燥して溶媒を除去することにより、29.5mgのペプチドを得た。その少量について、実施例3に記載の方法により抗菌活性を調べたところ、高い抗菌活性の存在を確認し、前記の分子量7.9kDaのペプチドが本発明の抗菌ペプチドであることを同定した。このようにして得られた抗菌ペプチドをダイアボジン(diapausin)と命名した。得られた精製抗菌ペプチドを遠心乾燥して溶媒を除去し、抗菌活性の測定〔後述の実施例3参照〕に供するまで-20℃に保存した。なお、本抗菌ペプチドはインシュリンを標準とするビシンコニン酸法[Smith, P.K. et al.: Anal. Biochem., 150:76(1985)]によって定量した。

【0062】〔実施例2〕ダイアボジンの生化学的性質の分析

(1) アミノ酸配列の分析

実施例1で分離・精製したダイアボジンをエドマン分解[Edman, P.: Acta Chem. Scand., 10:761(1956)]にかけ、生じたPTH-アミノ酸をアミノ酸配列自動分析機(島津製作所製、PPSQ-21)によって分析した。なお、システイン(Cys)については、4-ビニルピリジンと反応させ[Krull, I. et al.: Anal. Biochem., 40:80(1971)]、生じたS-ビリジルエチル-システンをアミノ酸配列自動分析機によって分析した。その結果、41個のアミノ酸から成るダイアボジンのアミノ酸配列が下記のように決定された(配列番号1)。

【0063】

一致した。

【0065】(2) 休眠成虫体内におけるダイアボジンの局在部位の分析

コガタリハムシ休眠成虫(1ヵ月後)について、その全体、組織(脂肪体、消化管、脳および精巢)または体液を以下の方法で分析し、休眠成虫体内におけるダイアボジンの局在部位を調べた。全体または各組織を3倍量(v/w)の試料用緩衝液[5mM EDTA, 1mM 弗化フェニルメチルスルフォニル(PMSF), 1mMベンズアミジン(benzamidine), 1μg/mlペプスタチンA(pepstatin A), 1μg/mlロイペプチン(leupeptin), 62.5mM Tris-HCl, pH 6.8][Deutscher, M. P.: Methods in Enzymol., 182: 83 (1990)]とともに氷冷下で磨砕し、4℃で10,000×g/20分間の遠心分離に供して上清を得た。また、休眠成虫(100頭)の体液を、あらかじめ体液の褐変防止のためのフェニルチオ尿素粉末を入れた1.5mlチューブに氷冷下で採取した。採取した体液(約100μl)を4℃で10,000×g/20分間の遠心分離に供して血球成分を除去し、上清を得た。

【0066】このようにして得られた各上清(ペプチド試料)について、全体磨砕物(0.2頭相当)、体液(0.5頭相当)、脂肪体磨砕物(0.5頭相当)、消化管磨砕物(4頭相当)、脳磨砕物(4頭相当)、および精巢磨砕物(4頭相当)の上清を、16.5%ポリアクリルアミドゲル(縦80×横90mm, 厚さ1mm, 溝12箇所)によるTris-TRICINE SDS電気泳動[Laemmli, U. K.: Nature, 227: 680 (1970)]に供した。

【0067】一方、実施例1において精製されたダイアボジンをフロイント不完全アジュバント[日本生化学会編、新生化学実験講座12: 3ページ、東京化学同人(1992)]とともに、白兔に注射し(0.1mg/匹)、30日後に追加免疫を行った。次に、追加免疫後40日目の白兔から採血し、硫酸塩析の後、プロテインA-Sepharose(Pharmacia製)アフィニティークロマトグラフィーにかけ、抗体を精製した。得られた抗体を用いて、ウェスタンブロッティング[Towbin, H. T. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4350 (1979)]によるダイアボジンの検出に供した。

【0068】なお、SDS電気泳動ゲル中のペプチドは、0.125%クーマジーブリリアントブルーR-250によって染色した。その結果、図5に示したように、ダイアボジンの抗体と特異的に結合する分子量7.9kDaのペプチド(矢印)が、休眠成虫において体液と脂肪体に検出され、消化管、脳および精巢には検出されなかった。これらの結果より、分子量7.9kDaのペプチド(ダイアボジン)は、休眠成虫の主として体液と脂肪体に局在することが判明した。

【0069】(3) 成虫体内におけるダイアボジンの休眠前後における増減の分析

コガタリハムシについて、6.25頭相当の休眠前成虫(羽化1日後)、休眠成虫(1ヵ月後)、または越冬成虫(4月下旬頃)の全体(約100mg)を(3)に記載の手法と同様にして、300μlの試料用緩衝液[5mM EDTA, 1mM

弗化フェニルメチルスルフォニル(PMSF), 1mMベンズアミジン(benzamidine), 1μg/mlペプスタチンA(pepstatin A), 1μg/mlロイペプチン(leupeptin), 62.5mM Tris-HCl, pH 6.8]とともに氷冷下で磨砕し、4℃で10,000×g/20分間の遠心分離に供した。

【0070】得られた上清(ペプチド試料)のタンパク量を、牛血清アルブミンを標準としてビシンコニン酸法で定量した。その後、タンパク量50μg相当の各上清を(2)に記載の手法と同じ条件でSDS電気泳動に供した。その結果、図6に示したように、分子量7.9kDaのペプチド(ダイアボジン)(矢印)は、成虫体内において休眠前から休眠中にかけて出現し、越冬後には著しく減少することがわかった。

【0071】(4) 質量分析

実施例1で分離・精製したダイアボジンのMALD-TOF MSスペクトルを、質量分析機(島津製作所製、Kartos Compact MALDI 4 V5.1.2.: + Linear High Power: 40)を使用し、Hillenkampらの方法[Hillenkamp, F. et al.: Anal. Chem., 63: 1193A (1991)]で測定した。最大ピークの測定値からプロトン(H+)の質量=1を除去して平均分子量を求めた。その結果、SDS電気泳動によるダイアボジンの推定分子量は7.9kDaであったが、図7に示したように、分子量4467.3にピークが表れたことから、ダイアボジンの正確な平均分子量は4,466Da(最大誤差0.1%)であることが明らかとなった。なお、図7の2.233.8のピークはH<sub>2</sub><sup>+</sup>によって荷電したダイアボジンのピークである。

【0072】〔実施例3〕ダイアボジンの抗菌活性の測定

植物病原性菌類に対する抗菌活性の測定は、96穴マイクロプレートを使用する方法[Cammue, B. P. A. et al.: J. Biol. Chem., 267: 2228 (1992)]によって行った。すなわち、アルタナリア菌(*Alternaria alternata*)、灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*)または、いもち病菌(*Magnaporthe grisea*)の胞子を過滅菌済み合成培地(Cammue, B. P. A. et al.: J. Biol. Chem., 267: 2228 (1992)記載の2倍濃度)[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5mM), MgSO<sub>4</sub> (100μM), CaCl<sub>2</sub> (100μM), FeSO<sub>4</sub> (10μM), CoCl<sub>2</sub> (0.2μM), CuSO<sub>4</sub> (0.2μM), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (4μM), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (1μM), KI (0.2μM), ZnSO<sub>4</sub> (1μM), MnSO<sub>4</sub> (0.2μM), グルコース (20g/l), L-アスパラギン (2g/l), L-メチオニン (40mg/l), myo-イノシトール (4mg/l), ビオチン (0.4mg/l), 塩酸チアミン (2mg/l), 塩酸ピリドキシン(0.4mg/l)]に懸濁させ、胞子懸濁液(2.5×10<sup>4</sup> 胞子数/ml)を調製した。この胞子懸濁液(40μl)を96穴マイクロプレートの各穴に入れた後、実施例1で分離・精製したダイアボジンの水溶液(40μl)を加えて被検液とした。

【0073】対照として、ダイアボジンの水溶液の代わりに滅菌水(40μl)を加えたものを用いた。その後、2

7℃でインキュベートし、0時間後と48時間後における595nmの吸光度をマイクロプレートリーダー（BIO-RAD製、Model 3550-UV）を用いて測定した。得られた測定値から、菌体の発育阻止率を以下のように計算した。すなわち、対照における吸光度の変化（ $\Delta C$ ）から被検液における吸光度の変化（ $\Delta T$ ）を引き算して得られる数値の $\Delta C$ に対する百分率、すなわち  $[(\Delta C - \Delta T)] / \Delta C \times 100$  を算出して発育阻止率（%）とした。被検液中の精製ダイアボジンの濃度を0～800  $\mu\text{g/ml}$ と変化させたときの植物病原性菌類の発育阻止率を図8に示した。図8において、各点は「平均値（ $n=2$ ） $\pm$  範囲」を表わす。図8から明らかなように、本発明のダイアボジンは *A. alternata*、*B. cinerea* および *M. grisea* の3種病原性菌類に対して抗菌活性を示し、特に *B. cinerea* に対して強い抗

#### 配列

Ala Val Arg Ile Gly Pro Cys Asp Gln Val Cys Pro Arg Ile Val Pro  
 1 5 10 15  
 Glu Arg His Glu Cys Cys Arg Ala His Gly Arg Ser Gly Tyr Ala Tyr  
 20 25 30  
 Cys Ser Gly Gly Gly Met Tyr Cys Asn  
 35 40

#### 【図面の簡単な説明】

- 【図1】 逆相クロマトグラフィーの結果を示す図である。  
 【図2】 SDS電気泳動の結果を示す写真である。  
 【図3】 逆相クロマトグラフィーの結果を示す図である。  
 【図4】 SDS電気泳動の結果を示す写真である。

菌活性を示すことがわかった。

#### 【0074】

【発明の効果】 本発明により、抗菌活性を有する生理活性ペプチドが提供される。本発明の生理活性ペプチドは、植物病原菌、特に植物病原性菌類に対する殺菌剤として有用である。

#### 【0075】

##### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：41

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

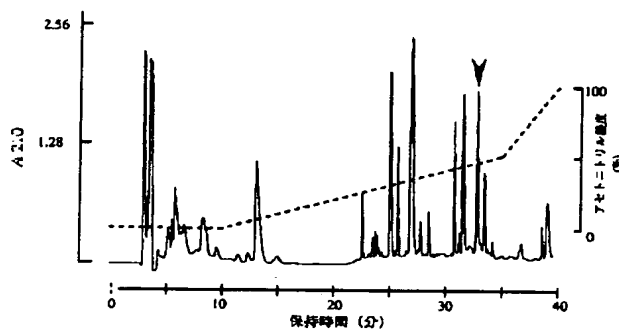
【図5】 SDS電気泳動及びそれに続くウェスタンブロッティングの結果を示す電気泳動写真である。

【図6】 SDS電気泳動の結果を示す写真である。

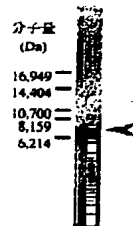
【図7】 ダイアボジンの質量分析の結果を示す図である。

【図8】 ダイアボジンの植物病原性菌類に対する抗菌活性を示す図である。

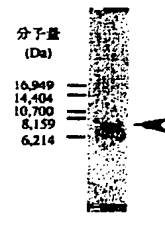
【図1】



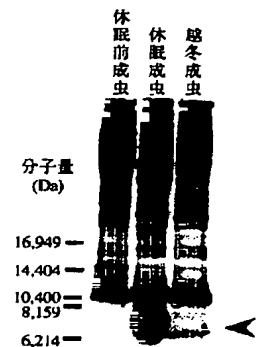
【図2】



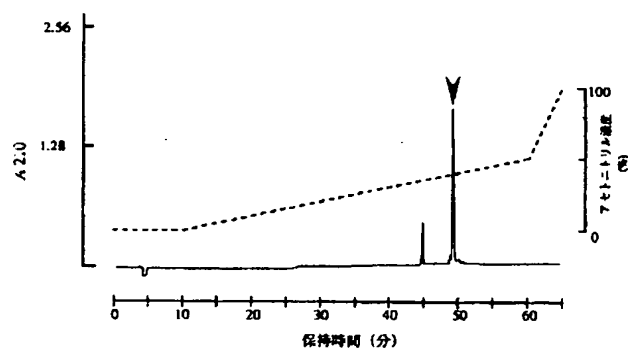
【図4】



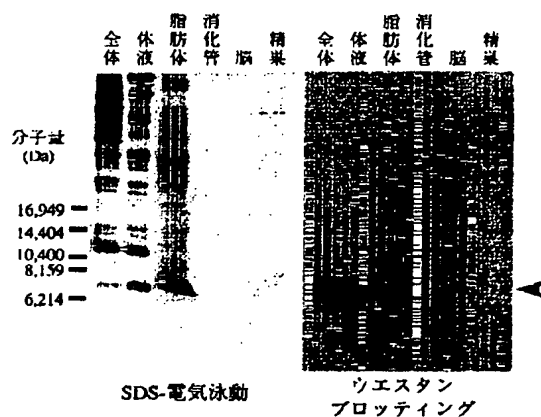
【図6】



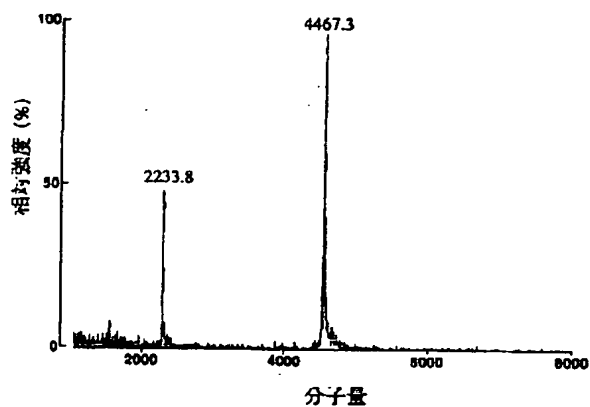
【図3】



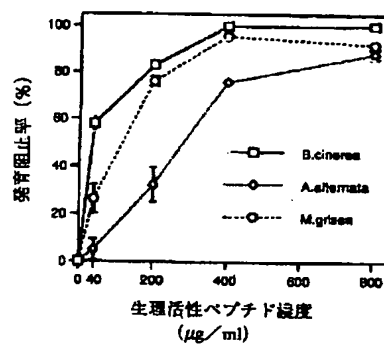
【図5】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

// C 1 2 P 21/08

識別記号

F I

C 1 2 P 21/08